

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication : 2 710 068  
(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)  
(21) N° d'enregistrement national : 93 10864  
(51) Int Cl<sup>e</sup> : C 07 D 405/04, C 12 P 21/08, C 07 K 2/00(C 07 D 405/04, 265:32, 239:46)

(12)

## BREVET D'INVENTION

B1

(54) DERIVES DE NUCLEOSIDES, PROCEDES DE FABRICATION DE CES DERIVES DE NUCLEOSIDES ET ANTICORPS POLYCLONAUX ET MONOCLONAUX SPECIFIQUES DE CES DERIVES.

(22) Date de dépôt : 13.09.93.

(30) Priorité :

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : 24.03.95 Bulletin 95/12.

(45) Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention : 20.10.95 Bulletin 95/42.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche :

*Se reporter à la fin du présent fascicule*

(71) Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L ENERGIE ATOMIQUE - Etablissement de Caractère Scientifique, Technique et Industriel - CENTRE NATIONAL D ETUDES SPATIALES. -FR.

(72) Inventeur(s) : MOLKO DIDIER - CADET JEAN - CIMAZ ISABELLE

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : BREVATOME

FR 2 710 068 - B1



MONOCOLONAUX SPECIFIQUES DE CES DERRIVES  
DERRIVES DE NUCLEOSIDES ET ANTICORPS POLYCLONAIRES ET  
DERRIVES DE NUCLEOSIDES, PROCEDES DE FABRICATION DE CES

5 L'invention concerne des dérivés de nucléosides, spécifiques des anticorps polyclonaux et monoclonaux, ainsi que des anticorps polyclonaux et monoclonaux des procédés de fabrication de ces dérivés de nucléosides.

10 La macro molécule d'A.D.N. (acide désoxyribonucleique) est le constituant des chromosomes et les cellules différentes segments de cette molécule forment les gènes, supports des caractères héréditaires. L.A.D.N. se présente sous la forme d'une double hélice spirale, formée alternativement de sucre (désoxyribose) et de phosphate, les spirales des deux chaînes étant réunies localement par des groupements de bases nucléiques azotées, de type purinique ou pyrimidinique. Les nucléotides constituant l'A.D.N. sont les esters phosphoriques des nucléosides.

15 Les bases nucléiques de l.A.D.N. d'un individu (ou d'un animal ou d'un végétal) peuvent être modifiées et endommagées lorsqu'elles sont irradiées à un rayonnement solaire intense, au rayonnement cosmique (volts intercontinentaux), à des photonsibillateurs, au contact avec l'amianté ou à une irradiation ionisante, que celle-ci soit accidentelle ou due à un traitement de radiothérapie. Ces modifications des bases nucléiques de l.A.D.N. pouvant entraîner une survenue.

20 Il serait donc intéressant de mettre au point une technique de dosage susceptible d'être utilisée chez l'individu concerné, il est particulièrement important de détecter si de telles modifications se sont produites et de préciser la nature des modifications de l'individu.

25 Ces modifications peuvent entraîner une ionisation, que celle-ci soit accidentelle ou due à un traitement de radiothérapie. Ces modifications des bases nucléiques de l.A.D.N. pouvant entraîner une irradiation ionisante, que celle-ci soit accidentelle ou due à un rayonnement solaire intense, au rayonnement cosmique (volts intercontinentaux), à des photonsibillateurs, au contact avec l'amianté ou à une irradiation ionisante, que celle-ci soit accidentelle ou due à un rayonnement solaire intense, au rayonnement cosmique (volts intercontinentaux), à des photonsibillateurs,

30 au contact avec l'amianté ou à une irradiation ionisante, que celle-ci soit accidentelle ou due à un rayonnement solaire intense, au rayonnement cosmique (volts intercontinentaux), à des photonsibillateurs, au contact avec l'amianté ou à une irradiation ionisante, que celle-ci soit accidentelle ou due à un rayonnement solaire intense, au rayonnement cosmique (volts intercontinentaux), à des photonsibillateurs,

35 au contact avec l'amianté ou à une irradiation ionisante, que celle-ci soit accidentelle ou due à un rayonnement solaire intense, au rayonnement cosmique (volts intercontinentaux), à des photonsibillateurs,

les patients suspectés d'avoir subi des modifications de leur A.D.N.

Parmi les diverses techniques de dosage permettant de déterminer la présence d'A.D.N. modifié dans un échantillon, les immunodosages consistent à faire réagir un anticorps spécifique d'une modification particulière de l'A.D.N avec un échantillon contenant de l'A.D.N isolé ou hydrolysé. Ces anticorps sont généralement produits par clonage.

La fabrication d'anticorps polyclonaux (ou monoclonaux) nécessite tout d'abord la fabrication d'antigènes spécifiques, c'est-à-dire de nucléosides ou de nucléotides dont les bases nucléiques ont subi les modifications que l'on cherche à détecter, ces nucléosides ou nucléotides étant liés à une grosse molécule, par exemple une protéine. Un nucléoside ou un nucléotide seul trop petit n'est pas perçu par le système immunitaire. Ensuite, les anticorps polyclonaux sont produits par un mammifère qui a reçu une injection de l'antigène précité, cet antigène comprenant une protéine étrangère au mammifère considéré, liée à un haptène (molécule de petite taille contre laquelle on souhaite obtenir les anticorps spécifiques).

On connaît déjà d'après l'art antérieur des techniques de dosages immunologiques des acides nucléiques. L'article de Christopher P. WILD : "Antibodies to D.N.A. alkylation adducts as analytical tools in chemical carcinogenesis", Mut. Res., (1990), 233, 219-233, est justement consacré aux anticorps spécifiques de nucléotides dont les bases nucléiques ont subi des modifications par alkylation. Cet auteur insiste sur le rôle des anticorps dans les dosages immunologiques utilisés dans les études épidémiologiques des cancers humains et de la cancérogénèse chimique, due notamment à des agents alkylants.

L'article de B. D. Stollar : "Immunochemical Analyses of nucleic acids", Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, (1992), 42, 39-75, concerne également des anticorps spécifiques des acides nucléiques.

Par ailleurs, certains défauts oxydatifs de l'A.D.N. ont fait l'objet de plusieurs publications.

Ainsi, l'article de G.J. West et al. : "Radioimmunoassay of 8-hydroxyadenine", Int. J. Rad. Biol., (1982), 42, 481-490, décrit des dosages radio-immunologiques de la 8-hydroxyadénine. Cette modification de l'A.D.N. peut survenir après une irradiation aux rayons  $\gamma$ .

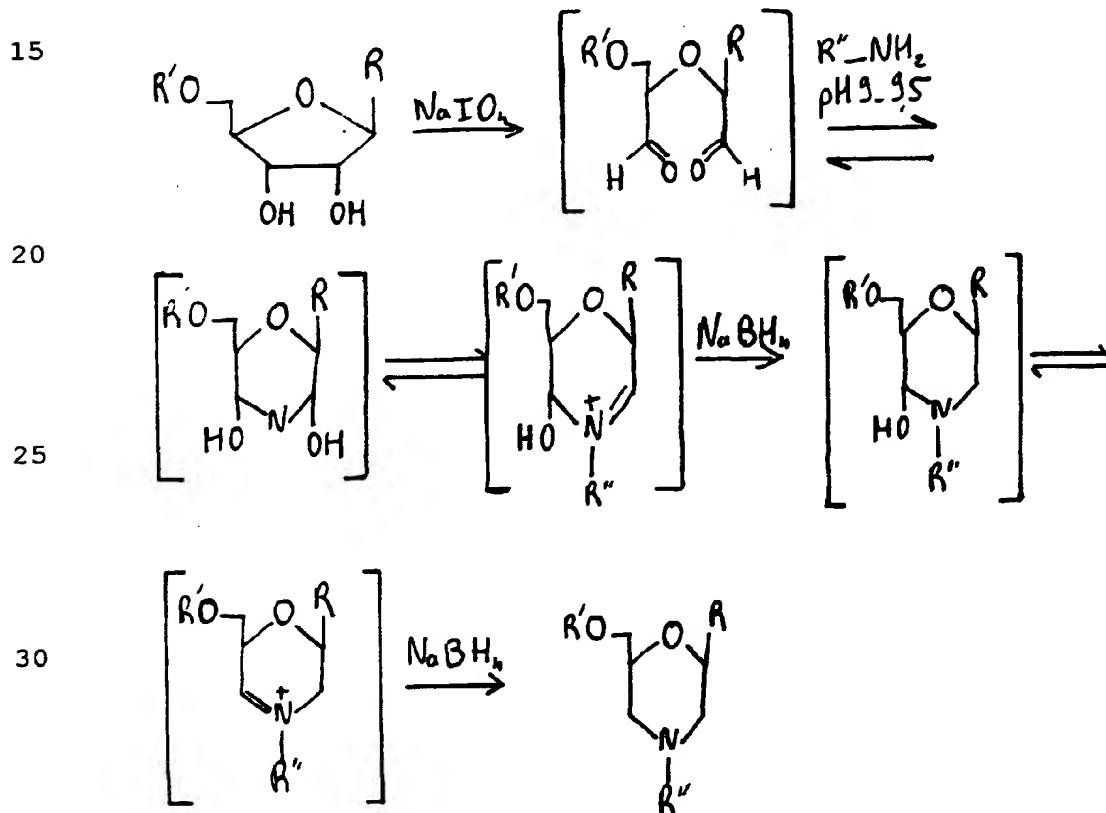
L'article de P. Degan et al., "Quantitation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by polyclonal antibodies", Carcinogenesis, (1991), 12, 865-871, décrit des anticorps polyclonaux spécifiques de la 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine et de la 8-hydroguanine. Ces anticorps polyclonaux peuvent être utilisés dans des dosages immunologiques afin d'isoler rapidement les deux types précités de guanosine modifiée, dans un échantillon d'urine par exemple.

L'article de H.L. Lewis et al., "Serologic Assay of DNA Base Damage", Rad. Res. (1978), 75, 305-316, concerne la préparation d'anticorps polyclonaux et le dosage de la 5-hydroxyméthyldésoxyuridine, obtenue après irradiation ionisante de la thymidine.

Enfin, l'article de S.A. Leadon et P.C. Hanawalt, "Monoclonal antibody to DNA containing thymine glycol", Mut. Res., (1983), 112, 191-200, concerne des anticorps monoclonaux de la 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymine (thymine glycol) obtenue après que de l'A.D.N. ait été soumis à des radiations ionisantes ou proches de l'ultraviolet. Ces anticorps monoclonaux ont été obtenus en faisant fusionner des cellules de miélome de souris

avec des cellules de rate provenant de la lignée de souris BALB-c, ces souris ayant été immunisées avec une poly(d-thymine) oxydée par  $\text{OsO}_4$  puis complexée avec de la sérumalbumine de bovin méthylée. Les tests sont effectués par des méthodes ELISA.

L'article de B.F. Erlanger et S.M. Beiser, "Antibodies specific for ribonucleosides and ribonucleotides and their reaction with DNA", Proc. N.A.S. USA, (1964), 52, 68-74, décrit un protocole de couplage d'un acide nucléique avec une protéine porteuse, permettant de former un antigène, susceptible d'être utilisé dans un protocole d'immunisation de lapins. Ce protocole de couplage est représenté ci-dessous.



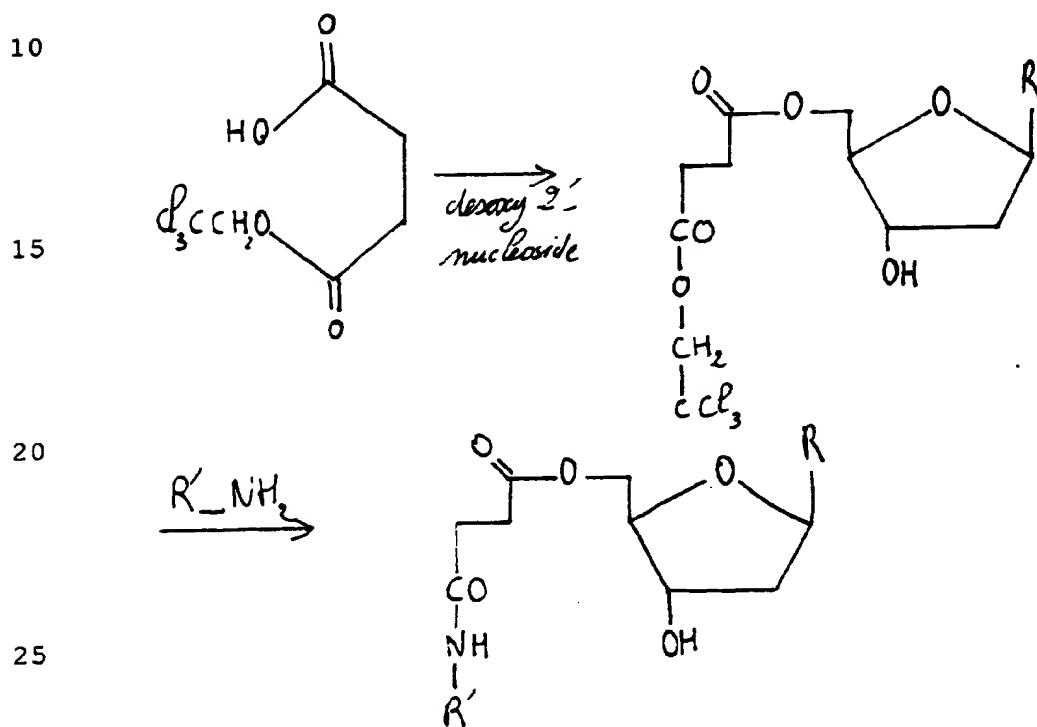
R représentant une base purinique ou pyrimidinique, R' représentant H ou -PO-(OH)<sub>2</sub> et R" représentant le reste d'une protéine.

Ce procédé consiste à agir sur l'ose d'un ribonucléoside par action du periodate de sodium. Le cycle de l'ose est ouvert entre les carbones 2' et 3' et il se forme un dialdéhyde. Ce dialdéhyde est alors couplé à une protéine, à un pH voisin de 9 à 9,5. Le NaBH<sub>4</sub> intervient pour réduire la base de Schiff obtenue comme produit intermédiaire.

Toutefois, le procédé divulgué dans cet article est limité à des bases nucléiques n'ayant pas subi de modifications. En effet, avec certaines bases fragiles sensibles à l'oxydation et/ou à la réduction, il serait impossible de modifier au préalable ces bases de nucléosides, puis de faire subir à ces nucléosides modifiés, une étape d'oxydation par le periodate de sodium, suivie d'une étape de réduction par le borohydrure de sodium. Après un tel traitement chimique, la plupart des défauts pour lesquels on souhaite étudier les A.D.N. modifiés, seraient altérés.

En outre, l'enchaînement des réactions décrit dans ce procédé est effectué sans isoler les produits intermédiaires. En conséquence, un certain nombre de produits parasites sont susceptibles d'apparaître au cours du procédé et d'être présents dans la protéine conjuguée finale. Chaque produit parasite peut potentiellement induire une réaction immunitaire qui lui est propre. Dans ce cas, le mélange d'anticorps obtenu pourrait n'avoir qu'une faible sélectivité. Ceci est le cas dans l'article de H.L. Lewis et al. précédemment cité, où la molécule cible était la 5-hydroxyméthyluracile et où l'anti-sérum obtenu reconnaissait également la thymine qui est une base naturelle de l'A.D.N.

On connaît également d'après l'article de T. Okabayashi et al., "A radioimmunoassay for 1- $\beta$ -D-Arabinofuranosylcytosine", Cancer Res., (1977), 17, 619-624, un procédé consistant à faire réagir un dérivé de l'acide succinique avec un désoxynucléoside dont la base a été modifiée, puis à créer une fonction amide avec l'amine libre d'une protéine. Ce procédé est illustré ci-dessous.



R représentant une base purinique ou pyrimidinique et R' le reste d'une protéine.

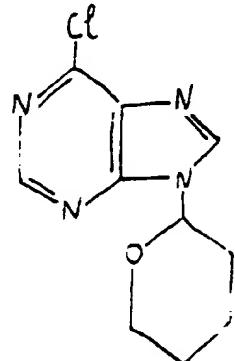
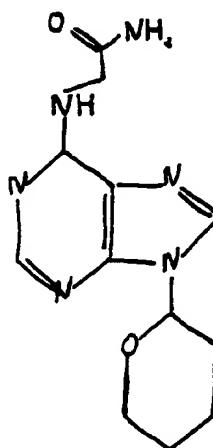
Le principal défaut de ce procédé réside dans le manque de stabilité de la fonction ester utilisée pour conjuguer le nucléoside à la protéine.

Enfin, on connaît également d'après un article de M.D. Friesen et al., "Isolation of Urinary

"3-methyladenine", Chem. Res. Toxicol., (1991), 4, 102-106, l'une des méthodes les plus employées pour coupler une base nucléique alkylée à une protéine. Cette méthode est illustrée ci-dessous.

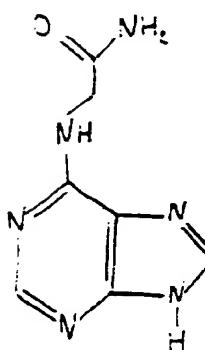
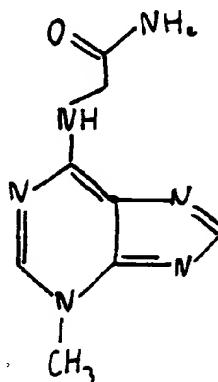
5

10


 $\xrightarrow[\text{pH } 8]{\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2}$ 

 $\xrightarrow[\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}]{\text{HCl}}$ 

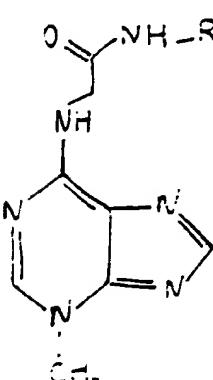
15

20


 $\xrightarrow{\text{CH}_3\text{I}}$ 

 $\xrightarrow[\text{R'-NH}_2]{\text{EDC}}$ 

25

30



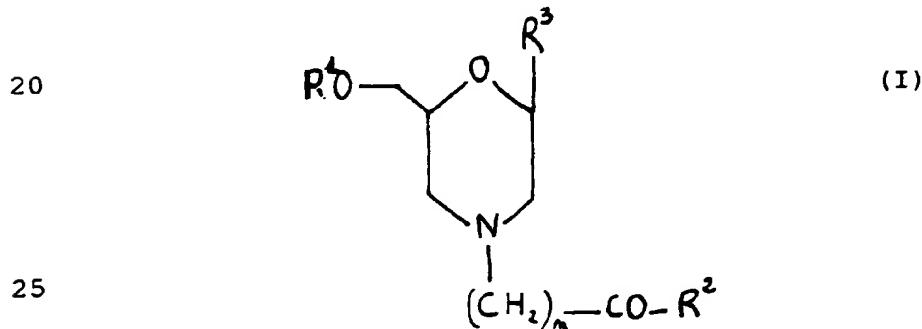
35

dans laquelle R est une protéine et EDC représente le chlorhydrure de 1-[3-diméthylamino)propyl]-3-éthyldicarbodiimide.

Cette méthode diffère des deux précédentes en ce que le produit de départ n'est ni un ribo ni un désoxyribonucléoside modifié, mais un dérivé alkyle de la base. Elle permet de former des anticorps d'une excellente qualité car l'haptène utilisé est purifié juste avant sa conjugaison à la protéine. Toutefois, cette technique est plus difficile à mettre en oeuvre que les deux procédés exposés précédemment.

L'invention a consisté à mettre au point des antigènes et des procédés de fabrication de ces antigènes évitant les inconvénients précédemment cités.

A cet effet, l'invention concerne des dérivés de nucléosides caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule chimique suivante :



dans laquelle R<sup>1</sup> représente H ou un acide mono, di ou tri-phosphorique linéaire, R<sup>2</sup> représente un groupe hydroxyle, un groupe alkyle, un groupe aryle, une protéine comprenant un site aminé, un aminoalkyl polystyrène ou une silice greffée avec une chaîne alkylamine et R<sup>3</sup> représente une base substituée choisie

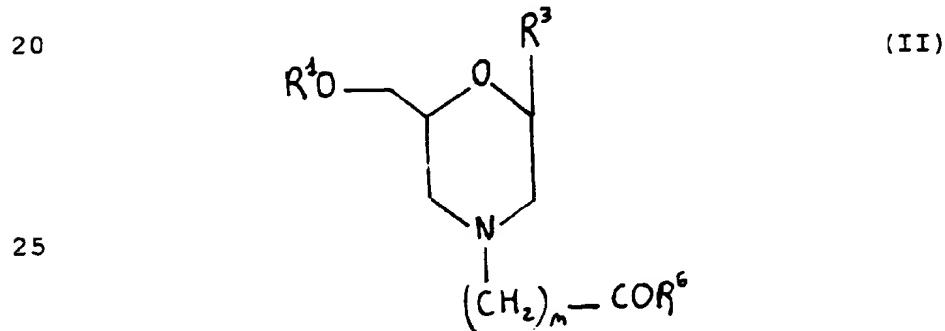
parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine.

On utilise l'expression "dérivés de nucléosides" puisqu'ils sont formés à partir de nucléosides, 5 toutefois dans ces dérivés l'ose a disparu et est remplacé par la morpholine.

Lorsque R<sup>2</sup> représente une protéine, l'antigène obtenu peut servir de base à la fabrication d'anticorps.

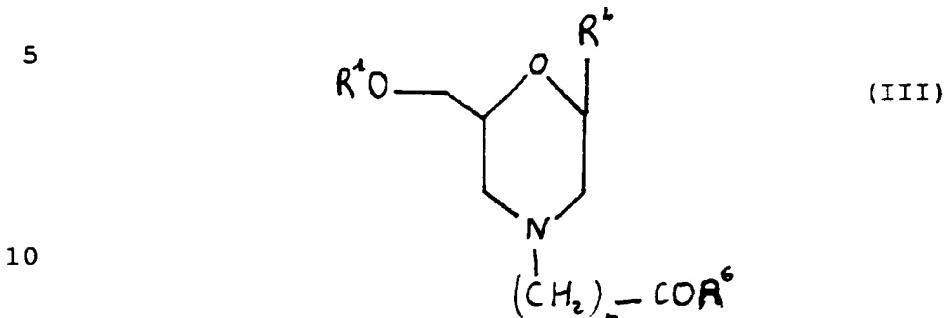
10 Lorsque R<sup>2</sup> est un aminoalkylpolystyrène ou une silice greffée, par exemple, le produit obtenu est un support solide auquel est lié l'haptène. De tels supports peuvent être utilisés dans des dosages de type ELISA (marque déposée).

15 L'invention concerne également un procédé de fabrication de dérivés de nucléosides répondant à la formule chimique suivante :



30 dans laquelle R<sup>1</sup> représente H ou un acide mono, di ou tri-phosphorique linéaire, R<sup>6</sup> représente un groupe hydroxyle, un groupe alkyle ou un groupe aryle et R<sup>3</sup> représente un base substituée choisie parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine,

consistant à faire réagir un agent substituant avec un dérivé de nucléoside répondant à la formule chimique suivante :



15 dans laquelle R<sup>1</sup> et R<sup>6</sup> ont la même signification que  
précédemment et R<sup>4</sup> représente une base nucléique  
choisie parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la  
guanine ou l'adénine.

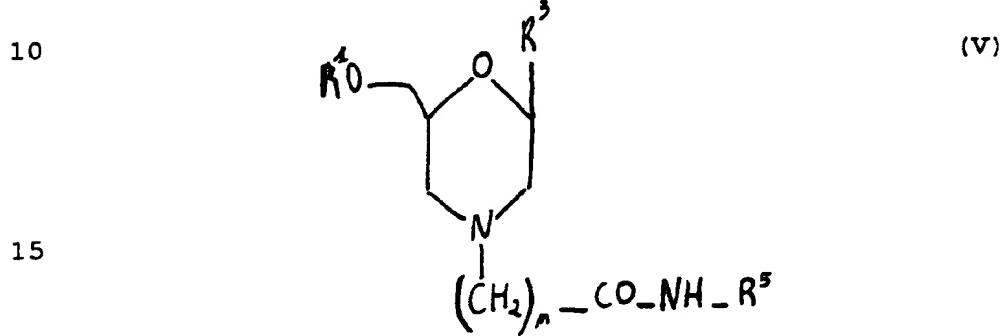
Contrairement à certains procédés connus de l'art antérieur, le procédé selon l'invention ne fait pas intervenir de liaison ester fragile entre le nucléoside modifié et la protéine. Les conjugués obtenus sont donc beaucoup plus stables et peuvent être stockés en solution sans être dégradés, pendant une période plus longue.

Le produit de départ (III) présente une morpholine à la place du cycle désoxyribosidique. Ce produit est stable. Il est en outre soigneusement purifié avant d'être utilisé dans le procédé. Ceci évite la présence de "parasites" ou contaminants dans l'haptène fabriqué.

Enfin, le produit de départ (III) a déjà subi la transformation du cycle osidique en cycle morpholinique avant que la base nucléique ne soit modifiée au cours du procédé selon l'invention. Cela permet d'envisager la préparation d'antigènes dans lesquels les bases

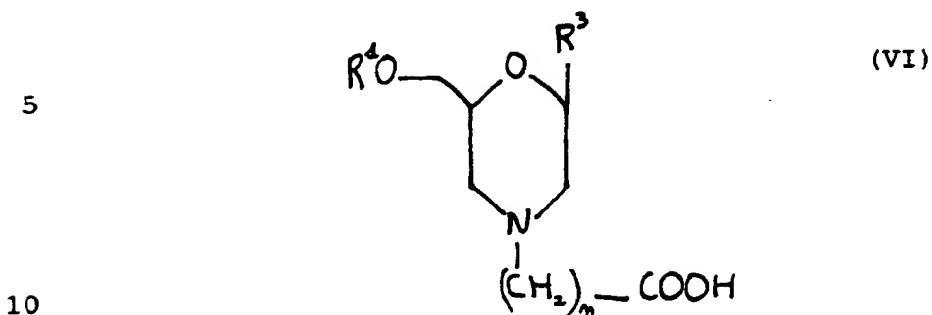
nucléiques sont oxydées ou réduites, ce qui est beaucoup plus difficile à obtenir si la synthèse du cycle morpholinique intervient après la modification de la base nucléique.

5 L'invention concerne également un autre procédé de fabrication de dérivés de nucléosides répondant à la formule chimique suivante :



20 dans laquelle  $\text{R}^1$  représente H ou un acide mono, di ou triphosphorique linéaire,  $\text{R}^3$  représente une base substituée choisie parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine et  $\text{R}^5$  représente le reste d'une protéine, un alkylpolystyrène ou une silice greffée avec une chaîne alkyle,

25 ce procédé consistant à faire réagir un composé du type  $\text{NH}_2-\text{R}^5$ , dans lequel  $\text{R}^5$  a la même signification que précédemment avec un dérivé de nucléoside répondant à la formule chimique suivante :

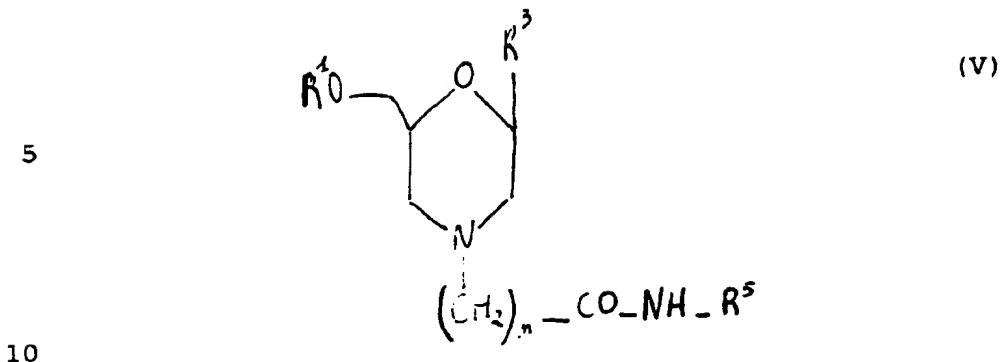


dans laquelle  $R^1$  et  $R^3$  ont la même signification que précédemment.

15        Lorsque  $\text{NH}_2\text{-R}^5$  est une protéine, le produit (V) obtenu est un antigène. Lorsque  $\text{NH}_2\text{-R}^5$  est un aminoalkylpolystyrène ou une silice greffée avec une chaîne alkylamine, le produit (V) obtenu est un support solide. Ainsi, dans un procédé de dosage ELISA, les 20 parois des tubes à essais ou les puits des plaques pourraient être recouverts de silice greffée, ce qui pourrait permettre de lier l'haptène au support de manière covalente.

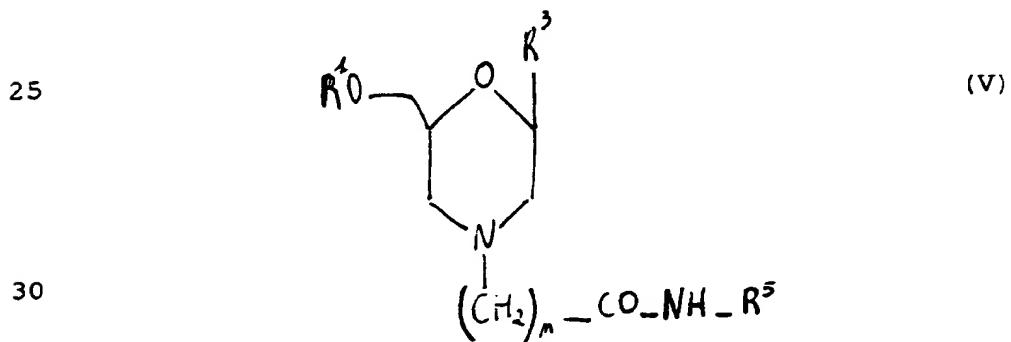
Par ailleurs, la Société Pharmacia commercialise  
un appareil destiné à étudier de manière dynamique les  
interactions entre molécules biologiques (connu sous la  
marque déposée BiaCore). Le principe consiste à fixer  
une molécule sur un support solide et à faire circuler  
une solution contenant l'autre protagoniste. Le support  
solide obtenu selon l'invention peut être utilisé dans  
ce type d'appareil.

Par ailleurs, l'invention concerne également des anticorps polyclonaux anti-dérivé de nucléosides, obtenus par immunisation d'un mammifère appropriée avec 35 l'antigène répondant à la formule chimique suivante :



dans laquelle  $R^1$  représente H ou un acide mono, di ou triphosphorique linéaire,  $R^3$  représente une base nucléique substituée choisie parmi l'uracile, la thymine, 15 la cytosine, la guanine ou l'adénine, et  $R^5$  représente une protéine ne provenant pas dudit mammifère.

Enfin, l'invention concerne des anticorps monoclonaux anti-dérivés de nucléosides obtenus en faisant fusionner des cellules de myélome d'un 20 mammifère avec des cellules spléniques de souris immunisées par un antigène répondant à la formule chimique suivante :

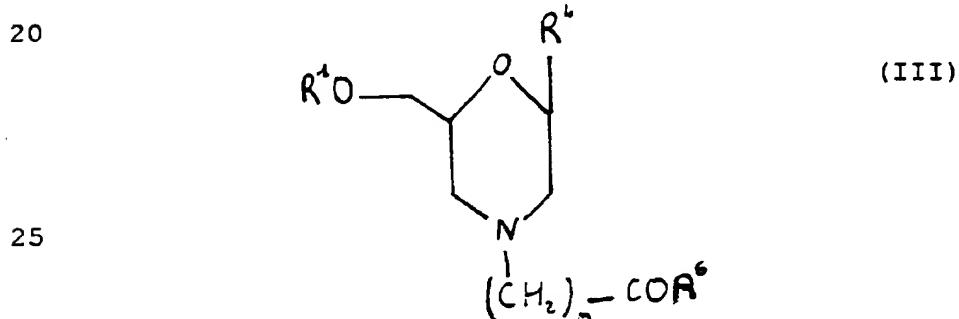


dans laquelle R<sup>1</sup> représente H ou un acide mono, di ou triphosphorique linéaire, R<sup>3</sup> représente une base nucléique substituée choisie parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine, et R<sup>5</sup> 5 représente une protéine ne provenant pas de la souris.

L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description suivante d'un mode de réalisation de l'invention donné à titre d'exemple illustratif et non limitatif.

10 Un premier procédé de préparation des dérivés de nucléosides selon l'invention consiste à utiliser un nucléotide ou un nucléoside déjà modifié par formation d'une morpholine, de façon à pouvoir se lier ultérieurement par exemple avec un groupe aminé appartenant à 15 une protéine.

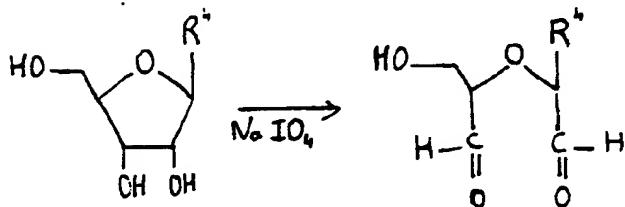
Le produit de départ (III) (dénommé ci-après "morpholinonucléoside") présente la formule chimique suivante :



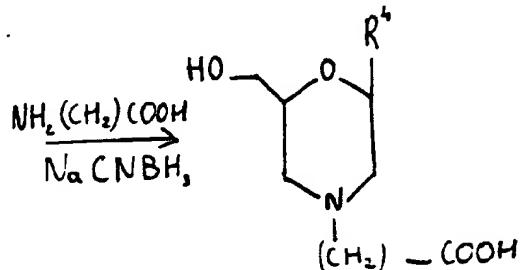
30 dans laquelle R<sup>1</sup> représente H ou acide mono, di ou tri-phosphorique linéaire, R<sup>6</sup> représente un groupe hydroxyle, un groupe alkyle ou un groupe aryle et R<sup>4</sup> représente une base nucléique choisie parmi l'uracile, 35 la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine.

Ce produit (III) peut étr obtenu par exemple selon un procédé décrit dans l'article de R. Rayford et al., "Reductive alkylation with oxydized nucleotides", J. Biol. Chem., (1985), 260, 15708-15713 et illustré ci-dessous :

10



15



20 R<sup>4</sup> ayant la même signification que précédemment.

Ce procédé consiste à faire réagir un nucléoside avec du periodate de sodium, afin d'ouvrir la liaison entre le carbone 2' et le carbone 3'. On obtient ainsi un dialdéhyde que l'on fait réagir avec du glycocolle pour former une double base de Schiff. On réduit cette double base par du NaCNBH<sub>3</sub> afin de conduire à un "morpholinonucléoside". Le nucléoside utilisé dans cet article était l'adénosine. Toutefois, de façon similaire, ce traitement peut être effectué avec d'autres bases puriniques ou pyrimidiniques. De même, le nucléoside peut être remplacé par un nucléotide dans lequel l'acide phosphorique est en position 5.

35 Lorsque R<sup>6</sup> est un groupe alkyle ou un groupe aryle, le produit III est un ester. Il peut être obtenu par le procédé qui vient d'être décrit en remplaçant le

glycocolle par un glycinate, tel qu'un glycinate d'éthyle ou de t-butyle, par exemple. De plus, ces dérivés peuvent être transformés en esters actifs pour être condensé sur une fonction amine.

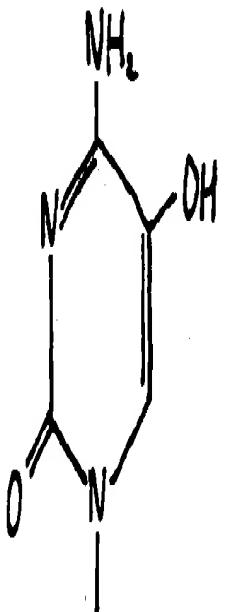
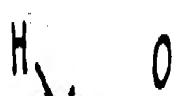
5 Le produit de départ (III) du procédé selon l'invention peut également être obtenu par n'importe quel autre procédé.

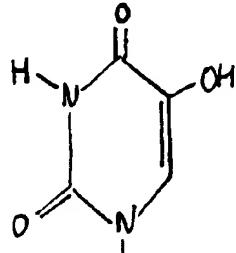
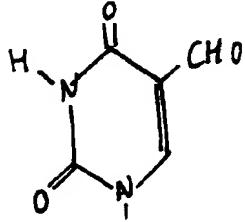
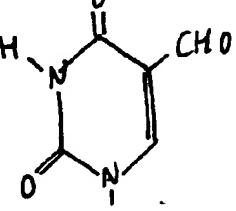
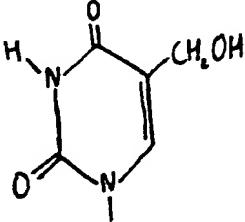
Les agents substituants permettant d'effectuer les substitutions sur les bases puriniques ou 10 pyrimidiniques, sont généralement des agents qui entraînent des modifications oxydatives de ces bases. Ces agents sont des agents chimiques ou un traitement physique. Les agents chimiques sont choisis par exemple 15 parmi l'ozone, le peroxyde d'hydrogène, le brome combiné à la collidine, le brome et l'oxyde d'argent, le permanganate de potassium, le tétraoxyde d'osmium, le méthanal ou  $\text{AlLiH}_4$ . Le même résultat pourrait être 20 obtenu par action de rayonnements ionisants en présence ou en l'absence d'oxygène, par photochimie (U.V. puis photosensibilisateur), par hydrogénéation catalytique ou 25 par traitement par le brome et l'eau puis hydrogénolyse. On donnera ci-après un tableau I récapitulatif des agents substituants et des substitutions qu'ils entraînent sur les différentes bases puriniques ou pyrimidiniques.

2710068

17

Tableau I

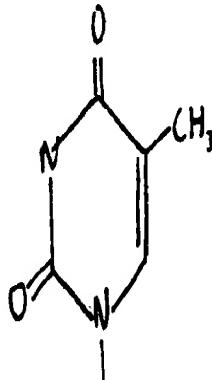
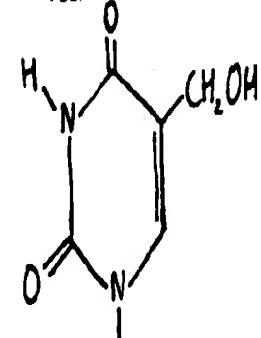
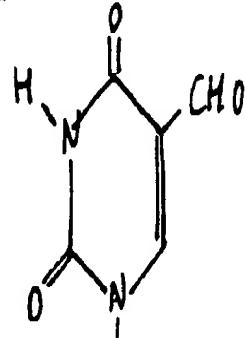
Bases nucléiques	Agent substituant	Bases substituées ( $R^3$ )
 cytosine	brome puis collidine ou rayonnements ionisants ou photochimie (U.V. + photosensibilisateur)	 (5-hydroxycytosine)-lyl
	ozone	

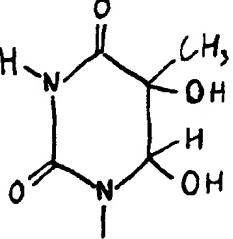
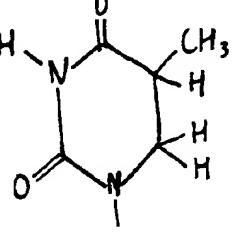
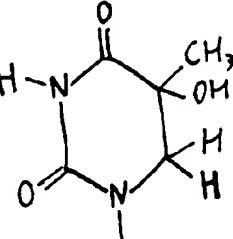
uracile	brome puis collidine ou rayonnements ionisants ou photochimie (U.V. + photosensibilisateur)	 (5-hydroxyuracil)-lyl
 H <sub>2</sub> CO		 (5-formyluracil)-lyl
	Al LiH <sub>4</sub>	 (5-hydroxymethyluracil)-lyl

2710068

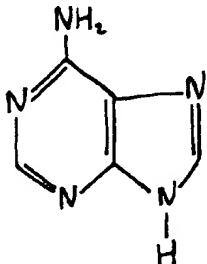
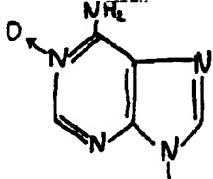
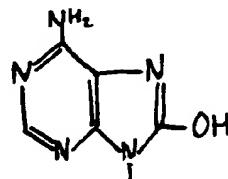
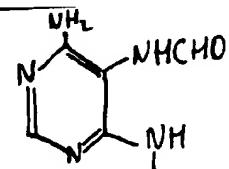
19

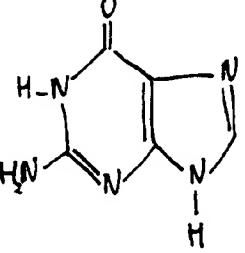
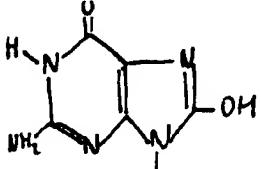
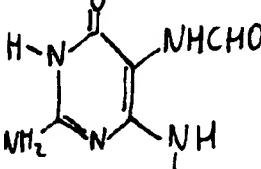
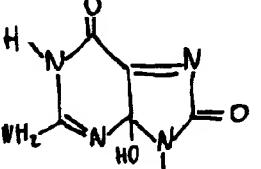
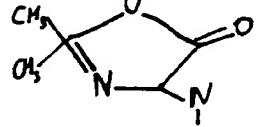
Tableau I (suite)

Bases nucléiques	Agent substituant	Bases substituées (R <sup>3</sup> )
thymine (ou 5-méthyluracile)  	rayonnements ionisants ou photochimie (U.V + photosensibilisateur)	 5-hydroxyméthyl- uracil-yl ou  5-(formyl-uracil)-yl
	ozone ou rayonnements ionisants	-NH-CHO

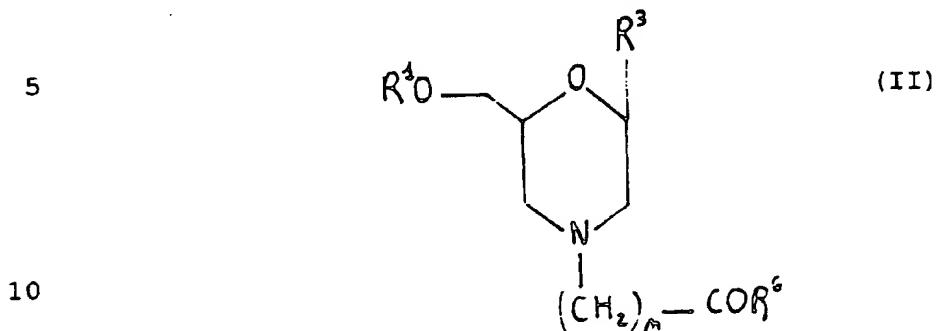
<p>KMnO<sub>4</sub> ou OsO<sub>4</sub> ou Br<sub>2</sub> puis Ag<sub>2</sub>O ou rayonnements ionisants ou photochimie (U.V. + photosensibilisateur)</p>	 <p>5,6-dihydro-5,6-dihydroxythymin-1-yl</p>
<p>hydrogène (par hydrogénéation catalytique en présence de Palladium ou de rhodium) ou photochimie (U.V. + photosensibilisateur) ou rayonnement ionisant en l'absence d'oxygène</p>	 <p>(5,6-dihydrothymin-1-yl)</p> <p>ou</p>  <p>(5,6-dihydro-5-hydroxythymin-1-yl)</p>

Tabl au I (suite)

Bases nucléiques	Agent substituant	Bases substituées
adénine 	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	 adénine-N1-oxyde
	Br <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O puis hydrogénolyse ou rayonnements ionisants ou photochimie (U.V. + photosensibilisateur)	 (8-oxo-7,8-dihydroadenine)-9yl
	rayonnements ionisants sans oxygène ou photochimie (U.V. + photosensibilisateur)	 [(6-amino-5-formylamino-pyrimidin)-4yl]amino

<p>guanine</p> 	<p><math>\text{Br}_2</math> puis hydrogénolyse ou rayonnements ionisants</p>	 <p>8-oxo-7,8-dihydroguanin-9yl</p>
	<p>rayonnements ionisants sans oxygène</p>	 <p>[(2-amino-6-oxo-5-formylamino-pyrimidin)-4yl]amino</p>
	<p>photochimie (U.V. + photosensibilisateur) ou oxygène singulet</p>	 <p>(4,8-dihydro-4-hydroxy-8-oxo-guanin)-9yl</p>
	<p>rayonnements ionisants ou photochimie (U.V. + photosensibilisateur)</p>	 <p>[(2,2-diamino-oxazyl-4 one)-5yl]amino</p>

A l'issue du procédé selon l'invention, on obtient l'haptène de formule chimique suivante :



15 dans laquelle R<sup>1</sup> représente H ou un acide mono, di ou triphosphorique linéaire, R<sup>6</sup> représente un groupe hydroxyle, un groupe alkyle ou un groupe aryle et R<sup>3</sup> est une base substituée choisi parmi la cytosine, l'uracile, la thymine, l'adénosine et la guanine et de préférence l'une des bases modifiées ou substituées du tableau I.

20 On notera que le produit II représente un certain  
nombre de variantes possibles du produit (I).

On donnera ci-après un exemple de préparation spécifique de l'un de ces haptènes.

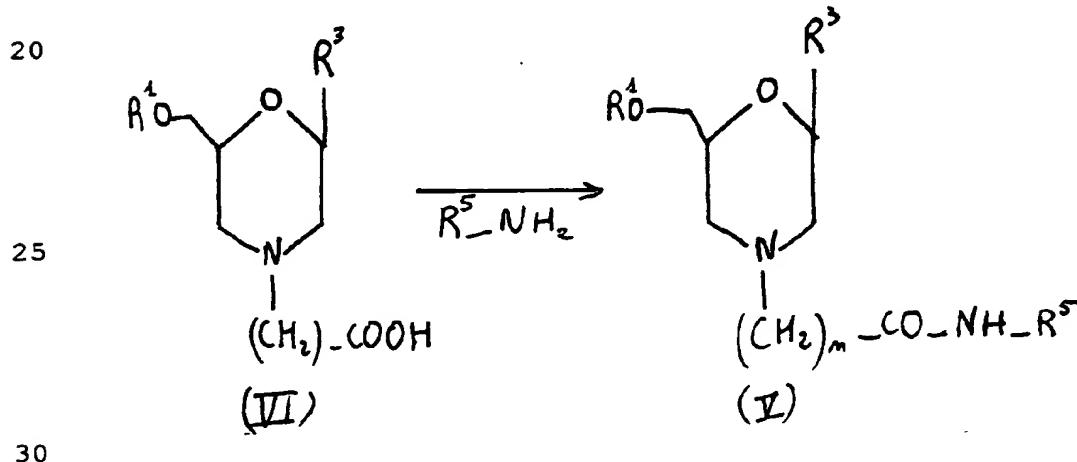
Exemple 1 : synthèse de la 2-(5-hydroxycytosine-1-yl)-4-carboxyméthyl-6-(hydroxyméthyl)-morpholine

On dissout 100mg de 1-(cytosine-1-yl)-4-carboxyméthyl-6-hydroxyméthyl morpholine dans 5 ml d'eau. On ajoute ensuite du brome goutte à goutte, jusqu'au maintien de la coloration jaune. Après 15 minutes d'agitation à température ambiante, l'excès de brome est chassé par barbotage d'air dans la solution. On ajoute ensuite 200 µl de collidine et la solution est agitée pendant 2 heures, à la température ordinaire. L'eau est évaporée sous pression réduite puis la collidine libre est éliminée par co-évaporation

de 5 ml d'éthanol. Le résidu obtenu est analysé par chromatographie liquide haute pression (colonne Nucleosil 10-C18, dimensions 6x300 mm, phase mobile acétate de triéthylammonium 50 mM et méthanol).

5 L'analyse montre la présence d'un produit majoritaire (60%) différent du composé de départ. L'analyse par RMN du produit collecté montre qu'il s'agit bien du composé attendu. Ce produit est caractérisé par un maximum d'absorption dans l'ultraviolet à 290,4 nm pour un 10 coefficient d'extinction moléculaire de 5700 mol.l<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>.

Le deuxième procédé selon l'invention consiste à traiter l'haptène (VI) obtenu à l'issue du premier 15 procédé de façon à former par exemple un antigène ou une phase solide (film, gel) dans laquelle l'haptène VI est fixé au support de manière covalente. Ce procédé est rappelé ci-dessous :



R<sup>1</sup> et R<sup>3</sup> a la même signification que précédemment et R<sup>5</sup> représente le reste d'une protéine, un alkyl polystyrène ou une silice greffée avec une chaîne 35 alkyle.

L'haptène de départ (VI) est purifié par chromatographie liquide à haute pression avant d'être couplé au radical  $\text{NH}_2\text{-R}^5$ . Ce radical  $\text{R}^5$  peut être une protéine. Celle-ci est choisie par exemple parmi la sérum-albumine de bovin méthylée, l'ovalbumine de dinde ou de poulet ou les hémocyanines et notamment la KLH correspondant au terme anglais "keyhole limpet hemocianin", c'est-à-dire une protéine du coquillage connu sous le nom de bernique. On obtient alors un antigène susceptible d'être utilisé dans la fabrication d'anticorps. Lors de la fabrication d'anticorps polyclonaux, la protéine sera choisie de façon à être d'une nature différente de celle de l'animal utilisé pour la production d'anticorps. Les protéines précitées sont bien adaptées lorsque l'on souhaite immuniser un lapin.

Le radical  $\text{NH}_2\text{-R}^5$  peut également être un aminoalkylpolystyrène ou une silice greffée avec une chaîne alkylaminée. On obtient alors un film ou un gel dans lequel l'haptène est lié de manière covalente au support.

On notera que le produit (V) représente un certain nombre des variantes possibles du produit (I).

On donnera ci-après un exemple de réalisation de ce procédé.

Exemple 2 : Synthèse d'un conjugué haptène-protéine (antigène) :

On dissout 30mg (90 µmoles) de 1-(5-hydroxycytosine-1-yl)-4-carboxyméthyl-6-hydroxy-méthylmorpholine dans 2 ml d'eau. Ce composé dissous dans l'eau est ajouté, en 3 heures, à 5 ml d'une solution contenant 35 mg (180 µmoles) de E.D.C. ( $\text{N}'\text{-(3-diméthylaminopropyl)-N-éthylcarbodiimide(chlorhydrate)}$ ) et 80 mg de sérumalbumine de bovin. Après avoir laissé reposer cette solution pendant une nuit à température

ambiante, l'eau est évaporée sous pression réduite et le résidu obtenu est dissous dans 2 ml d'eau et analysé par chromatographie d'exclusion, (colonne Fractogel TSK-HW40 de Merck, dimensions 20x400 mm, phase mobile 5 NaCl 0,15 M).

Le produit élué en premier est collecté, dialysé contre de l'eau et la solution obtenue est alors lyophilisée. On mesure alors la charge du produit en haptène. Cette mesure est obtenue en comparant le spectre 10 d'absorption U.V. de la protéine d'origine à celui de la protéine greffée sur le nucléoside modifié. La comparaison de l'absorption à 270 et 300 nm permet de déterminer que 7,8 moles de 1-(5-hydroxycytosin-1-yl)- 15 4-carboxyméthyl-6-hydroxyméthylmorpholine sont greffés par mole de protéine.

L'invention concerne enfin les anticorps spécifiques des antigènes (V) obtenus par le procédé précédent, dans lequel R<sup>5</sup> représente le reste d'une 20 protéine.

Les anticorps polyclonaux sont obtenus de façon tout à fait classique par injection à des lapins, comme cela sera détaillé ci-après. Toutefois, l'anticorps obtenu est nouveau puisqu'il est spécifique du nouvel 25 antigène précédemment préparé.

On donnera ci-après un exemple de préparation de ces anticorps polyclonaux.

Exemple 3 : préparation d'anticorps polyclonaux spécifiques de l'antigène de l'exemple 2

30 Le protocole d'immunisation a été réalisé à partir de deux lapins femelles de race NZ "S.S.C." de 2 kg qui ont été traités de la façon décrite ci-après.

Une émulsion a été préparée en mélangeant 1 mg par litre du conjugué haptène-protéine précédemment préparé 35 dans l'exemple 2, avec 1 ml d'adjuvant complet de

Freund. Chaque lapin femelle a reçu 10 injections de 100 µl de l'émulsion précitée, dans le cou et sur le dos. Quatre semaines après les premières injections, les lapins ont reçu un premier rappel, pratiqué dans des conditions identiques. Après un nouvel intervalle de 4 semaines, ils reçoivent un nouveau rappel. Celui-ci est pratiqué par injection intramusculaire, au niveau de la hanche, de 0,5 ml d'une émulsion formée de 1 mg/ml de conjugué haptène-protéine et de 1 ml d'adjuvant incomplet de Freund.

Deux semaines plus tard, on prélève 2 à 5 ml de sang au niveau de l'oreille du lapin. Le sérum recueilli permet d'effectuer les premiers tests. Enfin, quatre semaines après le second rappel, un troisième rappel est effectué par injection intramusculaire selon le même principe que celui du deuxième rappel. Deux semaines plus tard, les lapins sont sacrifiés et l'on recueille le maximum de leur sang dont le sérum contient les anticorps spécifiques de l'antigène précité.

Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus de façon classique en faisant fusionner des cellules de myélome d'un mammifère tel qu'une souris avec des cellules de rate provenant par exemple de la lignée des souris BALB/c, ces souris ayant été immunisées par l'antigène (V) constitué par le morpholino nucléoside modifié lié à la protéine porteuse, ( $R^5$  représentant une protéine). Ces anticorps sont spécifiques des nouveaux antigènes obtenus par le procédé selon l'invention.

On donnera ci-après un exemple de préparation de ces anticorps monoclonaux.

Exemple 4 : préparation d'anticorps monoclonaux spécifiques de l'antigène de l'exemple 2 (1-(5-

hydroxycytosin-1yl)-4-carboxyméthyl-6-  
hydroxyméthylmorpholine)

Immunisation :

Une suspension de l'antigène de l'exemple 2  
5 précité a été émulsionnée dans un volume identique  
d'adjuvant complet de Freund. Cette émulsion a été  
injectée par voie intra-péritonéale à des souris  
femelles de la lignée BALB/c, agées de 6 à 8 semaines,  
à raison d'une dose de 0,1 ml d'émulsion. Trois  
10 semaines plus tard, une injection de rappel par voie  
intra-péritonéale est effectuée avec une émulsion de  
l'antigène de l'exemple 2 et d'adjuvant incomplet de  
Freund. Deux semaines après cette injection de rappel,  
15 l'immunisation finale est réalisée par une injection  
dans les veines de la queue de la souris, cette  
injection comprenant l'antigène de l'exemple 2 dissous  
dans du NaCl 0,15 M

Fusion cellulaire et clonage :

Trois jours après la dernière injection de rappel,  
20 les rates ont été prélevées sur les souris et broyées.  
Les cellules de rate ont été lavées dans du milieu de  
Dulbecco modifié ne contenant pas de sérum (DMEM).  $10^8$   
cellules de rates ont été mélangées à  $10^7$  cellules de  
myélome puis centrifugées à 500xg pendant 7 minutes à  
25 température ambiante. On a éliminé le milieu et  
récupéré le culot de centrifugation auquel on a ajouté  
0,8 ml de PEG 4000 à 50% (Merck), sur une période de 1  
minutes avec agitation douce à 37°C. On y a ensuite  
ajouté du milieu de Dulbecco modifié, à raison de 1 ml  
30 pendant 1 minute, puis de 20 ml pendant 5 minutes. Les  
cellules ont été centrifugées à 200xg pendant 10  
minutes puis le culot de centrifugation a été remis en  
suspension dans 15 ml de DMEM et 10% de FBS (sérum  
foetal de bovin). Des aliquots de 0,05 ml ont été  
35 distribués dans des plaques munies de puits de culture

revêtus de macrophages. On a laissé incuber les plaques pendant 24 heures à 37°C avant d'ajouter dans le sputis de l'hypoxanthine ( $1.10^{-4}$  M) de l'améthoptérine ( $4.10^{-7}$  M) et de la thymidine ( $1,6.10^{-5}$  M) dans du DMEM (milieu HAT). Sept jours après la fusion, on a ajouté 0,025 ml de milieu HAT dans chaque puits et on a ensuite renouvelé le milieu tous les 3 à 4 jours. Les colonies ont été testées par la méthode ELISA pour leur activité à l'encontre de l'antigène de l'exemple 2. Seules, les cellules correspondant aux puits positifs ont été clonées.

## REVENDICATIONS

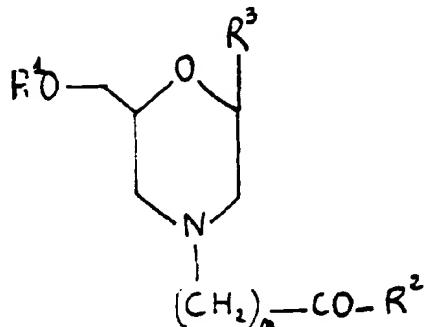
1. Dérivés de nucléosides caractérisés en ce qu'ils répondent à la formule chimique suivante :

5

(I)

10

15



20

dans laquelle R<sup>1</sup> représente H ou un acide mono, di ou tri-phosphorique linéaire, R<sup>2</sup> représente un groupe hydroxyle, un groupe alkyle, un groupe aryle, une protéine comprenant un site aminé libre, un aminoalkyl polystyrène ou une silice greffée avec une chaîne alkylamine et R<sup>3</sup> représente une base substituée choisie parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine.

30

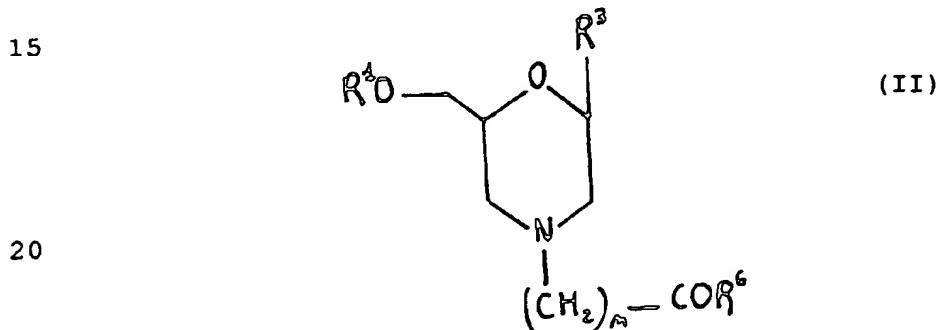
2. Dérivés de nucléosides selon la revendication 1, caractérisés en ce que R<sup>3</sup> est choisi parmi la (5-hydroxycytosin)-lyl, la (5-hydroxyhydantoïne)-lyl, -NH-CO-NH-CO-NH<sub>2</sub>, le (5-hydroxyuracil)-lyl, le (5-formyluracil)-lyl, le (5-hydroxyméthyluracil)-lyl, -NH-CHO, la (5,6-dihydro-5,6-dihydroxythymin)-lyl, la (5,6-

35

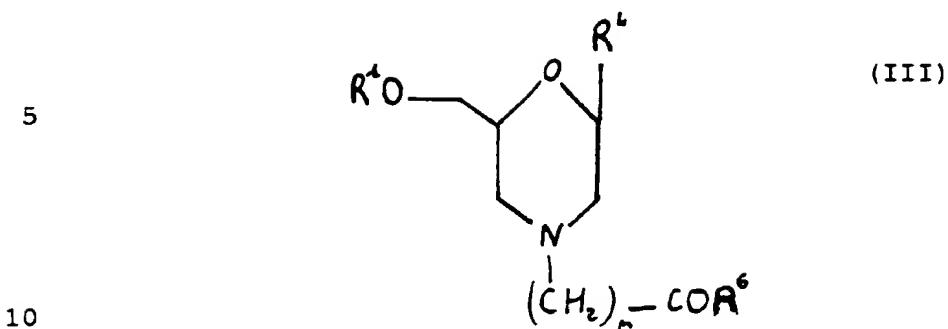
dihydrothymin)-lyl, la (5,6-dihydro-5-hydroxythymin)-lyl, l'adénine-N1-oxyde, la (8-oxo-7,8-dihydrooadénine)-9yl, la [(6-amino-5-formylamino-pyrimidin)-4yl]amino, la (8-oxo-7,8-dihydroguanin)-9yl, la [(2-amino-6-oxo-5-formylamino-pyrimidin)-4yl]amino, la (4,8-dihydro-4-hydroxy-8-oxo-guanin)-9yl ou la [(2,2-diamino-oxazol-4one)-5yl]amino.

3. Dérivés de nucléosides selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que R<sup>2</sup> représente une protéine choisie parmi la sérumalbumine de bovin méthylée, l'ovalbumine de dinde ou de poulet ou les hémocyanines.

4. Procédé de fabrication des dérivés de nucléosides répondant à la formule chimique suivante :



dans laquelle R<sup>1</sup> représente H ou un acide mono, di ou tri-phosphorique linéaire, R<sup>6</sup> représente un groupe hydroxyle, un groupe alkyle ou un groupe aryle et R<sup>3</sup> représente un base substituée choisie parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine, consistant à faire réagir un agent substituant avec un 30 dérivé de nucléoside répondant la formule chimique suivante :



15 dans laquelle R<sup>1</sup> et R<sup>6</sup> ont la même signification que précédemment et R<sup>4</sup> représente une base choisie parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine.

5. Procédé de fabrication selon la revendication  
4, caractérisé en ce que l'agent substituant est un  
agent chimique choisi parmi l'ozone, le peroxyde  
d'hydrogène, le brome combiné à la collidine, le brome  
et  $\text{Ag}_2\text{O}$ , le permanganate de potassium, le tétraoxyde  
d'osmium, le méthanal ou  $\text{AlLiH}_4$ .

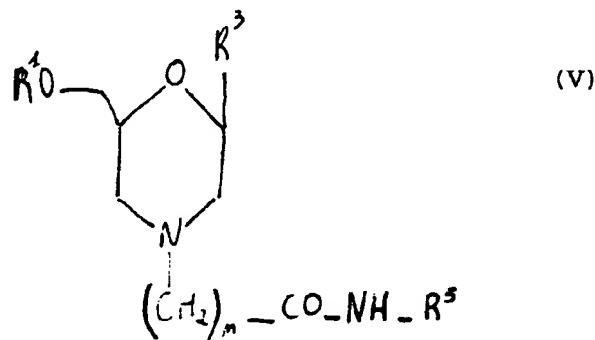
6. Procédé de fabrication selon la revendication  
4, caractérisé en ce que l'agent substituant est un  
traitement choisi parmi la photochimie, les  
rayonnements ionisants en présence ou en absence  
d'oxygène, l'hydrogénéation catalytique ou le traitement  
par le brome et l'eau, puis l'hydrogénolyse.

7. Procédé de fabrication selon la revendication  
4, caractérisé en ce que R<sup>3</sup> est choisi parmi la (5-  
hydroxycytosin)-1yl, la (5-hydroxyhydantoïne)-1yl, -NH-  
CO-NH-CO-NH<sub>2</sub>, le (5-hydroxyuracil)-1yl, le (5-  
formyluracil)-1yl, le (5-hydroxyméthyluracil)-1yl, -NH-  
CHO, la (5,6-dihydro-5,6-dihydroxythymin)-1yl, la (5,6-  
dihydrothymin)-1yl, la (5,6-dihydro-5-hydroxythymin)-

1yl, l'adénine-N1-oxyde, la (8--oxo-7,8-dihydrooadénine)-9yl, la [(6-amino-5-formylamino-pyrimidin)-4yl]amino, la (8-oxo-7,8-dihydroguanin)-9yl, la [(2-amino-6-oxo-5-formylamino-pyrimidin)-4yl]amino, 5 la (4,8-dihydro-4-hydroxy-8-oxo-guanin)-9yl ou la [(2,2-diamino-oxazol-4one)-5yl]amino.

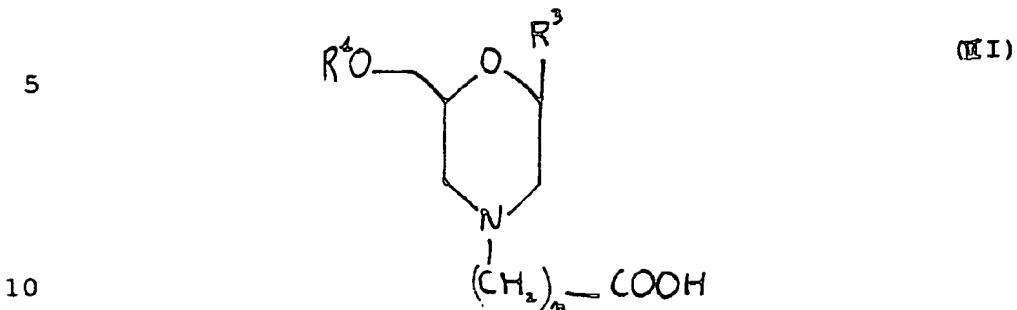
8. Procédé de fabrication d'un dérivé de nucléoside répondant à la formule chimique suivante :

10



15

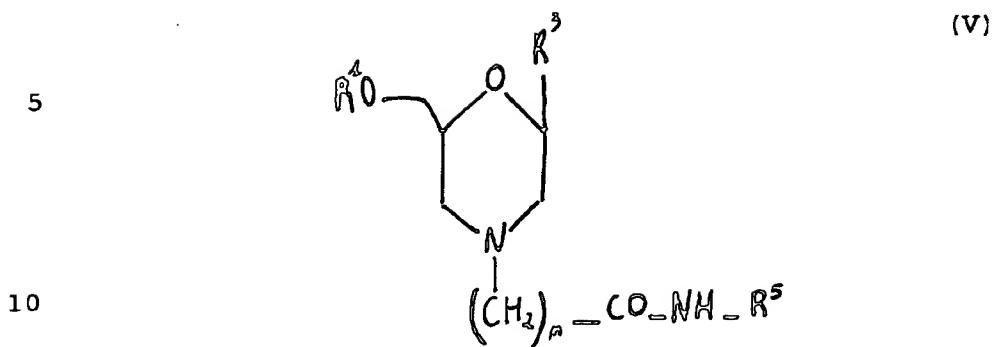
20 dans laquelle R<sup>1</sup> représente H ou un acide mono, di ou triphosphorique linéaire, R<sup>5</sup> représente le reste d'une protéine, un alkyl polystyrène ou une silice greffée avec une chaîne alkyle et R<sup>3</sup> représente une base substituée choisie parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine,  
25 ce procédé consistant à faire réagir un composé du type NH<sub>2</sub>-R<sup>5</sup>, dans lequel R<sup>5</sup> a la même signification que précédemment, avec un dérivé de nucléoside répondant à la formule chimique suivante :



dans laquelle  $R^1$  et  $R^3$  ont la même signification que précédemment.

15           9. Procédé de fabrication selon la revendication  
8, caractérisé en ce que R<sup>3</sup> est choisi parmi la (5-  
hydroxycytosin)-1yl, la (5-hydroxyhydantoïne)-1yl, -NH-  
CO-NH-CO-NH<sub>2</sub>, le (5-hydroxyuracil)-1yl, le (5-  
formyluracil)-1yl, le (5-hydroxyméthyluracil)-1yl, -NH-  
20 CHO, la (5,6-dihydro-5,6-dihydroxythymin)-1yl, la (5,6-  
dihydrothymin)-1yl, la (5,6-dihydro-5-hydroxythymin)-  
1yl, l'adénine-N1-oxyde, la (8-oxo-7,8-dihydroadénine)-  
9yl, la [(6-amino-5-formylamino-pyrimidin)-4yl]amino, la  
25 (8-oxo-7,8-dihydroguanin)-9yl, la [(2-amino-6-oxo-5-  
formylamino-pyrimidin)-4yl]amino, la (4,8-dihydro-4-  
hydroxy-8-oxo-guanin)-9yl ou la [(2,2-diamino-oxazol-  
4one)-5yl]amino.

10. Anticorps polyclonaux anti-dérivé de nucléoside, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par immunisation d'un mammifère approprié avec l'antigène répondant à la formule chimique suivante :



15 dans laquelle R<sup>1</sup> représente H ou un acide mono, di ou triphosphorique linéaire, R<sup>3</sup> représente une base nucléique substituée choisie parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine, et R<sup>5</sup> représente une protéine ne provenant pas dudit mammifère.

20 11. Anticorps polyclonaux selon la revendication 10, caractérisés en ce que R<sup>5</sup> représente une protéine choisie parmi la sérumalbumine de bovin méthylée, l'ovalbumine de dinde ou de poulet ou les hémocyanines.

25 12. Anticorps polyclonaux selon la revendication 10, caractérisés en ce que R<sup>3</sup> est choisi parmi la (5-hydroxycytosin)-lyl, la (5-hydroxyhydantoïne)-lyl, -NH-CO-NH-CO-NH<sub>2</sub>, le (5-hydroxyuracil)-lyl, le (5-formyluracil)-lyl, le (5-hydroxyméthyluracil)-lyl, -NH-CHO, la (5,6-dihydro-5,6-dihydroxythymin)-lyl, la (5,6-dihydrothymin)-lyl, la (5,6-dihydro-5-hydroxythymin)-lyl, l'adénine-N1-oxyde, la (8-oxo-7,8-dihydroadénine)-9yl, la [(6-amino-5-formylamino-pyrimidin)-4yl]amino, la (8-oxo-7,8-dihydroguanin)-9yl, la [(2-amino-6-oxo-5-formylamino-pyrimidin)-4yl]amino, la (4,8-dihydro-4-

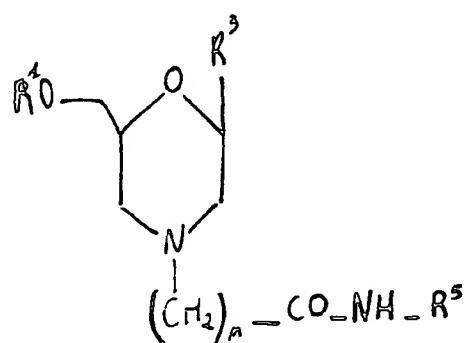
hydroxy-8-oxo-guanin)-9yl ou la [(2,2-diamino-oxazol-4one)-5yl]amino.

13. Anticorps monoclonaux anti-dérivés de nucléoside, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus en faisant fusionner des cellules de myélome d'un mammifère avec des cellules spléniques de souris immunisées par un antigène répondant à la formule chimique suivante :

10

15

20



dans laquelle R<sup>1</sup> représente H ou un acide mono, di ou triphosphorique linéaire, -R<sup>3</sup> représente une base nucléique substituée choisie parmi l'uracile, la thymine, la cytosine, la guanine ou l'adénine, et R<sup>5</sup> représente une protéine ne provenant pas de la souris.

14. Anticorps monoclonaux selon la revendication 13, caractérisés en ce que R<sup>5</sup> représente une protéine choisie parmi la sérumalbumine de bovin méthylée, l'ovalbumine de dinde ou de poulet ou les hémocyanines.

15. Anticorps monoclonaux selon la revendication 13, caractérisés en ce que R<sup>3</sup> est choisi parmi la (5-hydroxycytosin)-1yl, la (5-hydroxyhydantoïne)-1yl, -NH-

CO-NH-CO-NH<sub>2</sub>, le (5-hydroxyuracil)-1yl, le (5-formyluracil)-1yl, le (5-hydroxyméthyluracil)-1yl, -NH-CHO, la (5,6-dihydro-5,6-dihydroxythymin)-1yl, la (5,6-dihydrothymin)-1yl, la (5,6-dihydro-5-hydroxythymin)-1yl, l'adénine-N1-oxyde, la (8-oxo-7,8-dihydrooadénine)-9yl, la [(6-amino-5-formylamino-pyrimidin)-4yl]amino, la (8-oxo-7,8-dihydroguanin)-9yl, la [(2-amino-6-oxo-5-formylamino-pyrimidin)-4yl]amino, la (4,8-dihydro-4-hydroxy-8-oxo-guanin)-9yl ou la [(2,2-diamino-oxazol-4one)-5yl]amino.

# RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14 et L.612-17 du code de la propriété intellectuelle;  
articles 40 à 53 du décret n° 79-822 du 19 septembre 1979 modifié

## OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

Après l'accomplissement de la procédure prévue par les textes rappelés ci-dessus, le brevet est délivré. L'Institut National de la Propriété Industrielle n'est pas habilité, sauf dans le cas d'absence manifeste de nouveauté, à en refuser la délivrance. La validité d'un brevet relève exclusivement de l'appréciation des tribunaux.

L'I.N.P.I. doit toutefois annexer à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention. Ce rapport porte sur les revendications figurant au brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

## CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- Le demandeur a maintenu les revendications.
- Le demandeur a modifié les revendications.
- Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

## DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

2710068

N° d'enregistrement national :

93 10 864

N° de publication :

**1. ÉLÉMENTS DE L'ÉTAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ÊTRE PRIS EN CONSIDÉRATION POUR APPRÉCIER LA BREVETABILITÉ DE L'INVENTION**

Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
NEANT	

**2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT  
L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL**

WO-A-9 205 186 (GILEAD SCIENCES)

WO-A-9 118 898 (NIPPON SHINYAKU CO., Ltd.)

US-A-4 515 781 (PAUL F. TORRENCE et AL.)

CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 103, n° 25, 23 décembre 1985, Columbus, Ohio, US., abstract n° 210 401c. RAYFORD RICHARD et AL., page 478, colonne 02, & J. BIOL. CHEM. vol. 260, n° 29, 1985, pages 15 708-15 713.

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 52, n° 01, juillet 1964, pages 68-74, BERNARD F. ERLANGER et AL. .

CARCINOGENESIS, vol. 12, n° 05, 1991, pages 865-871, PAOLO DEGAN et AL.

PROGRESS IN NUCLEIC ACID RESEARCH AND MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, vol. 42, 1992, pages 39-77, B. DAVID STOLLAR.

MUTATION RESEARCH, Elsevier, vol. 233, 1990, pages 219-233, CHRISTOPHER P. WILD.

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE  
DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES**

Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
NEANT	